

動物遺伝資源の特性評価のためのマイクロサテライトDNAの効率的単離法

[要約] 動物遺伝資源の特性評価に資するため、マイクロサテライトDNAのゲノム中コピー数が少ない家禽において、pCR-Scriptベクター、点変異導入法およびmung beanヌクレアーゼを組み合わせることによってその効率的単離法を開発した。

農業生物資源研究所・遺伝資源第一部・動物探索評価研究チーム

連絡先 0298-38-7041

部会名	生物資源	専門	遺伝資源	対象	家禽類	分類	研究
部会名	畜産	専門	育種・遺伝	対象	家禽類	分類	研究

[背景・ねらい]

マイクロサテライトDNAは、数塩基の配列が繰り返しているもので、その代表としてCAリピートがある。マイクロサテライトDNAは、各染色体に広く分布し、対立遺伝子(allele)数が多いことから遺伝子マーカーとして哺乳動物の遺伝解析に広く用いられている。ところが家禽においては、既知のマイクロサテライトDNAマーカーは少ない。また、家禽のマイクロサテライトDNAの1ゲノムあたりのコピー数は、哺乳動物の約10分の1と少なく、従来法では新たなマイクロサテライトDNAのクローニングにかなりの時間と労力を要する。本研究では、マイクロサテライトDNAを応用した動物遺伝資源の遺伝特性評価に資するため、マイクロサテライトDNAの効率的なクローニング法を開発する。

[成果の内容・特徴]

- ① 点変異導入法(Kunkelら、1988)の操作手順を哺乳動物のマイクロサテライトDNAのクローニングに応用した方法(Ostranderら、1992)を改変し、家禽のマイクロサテライトDNAの効率的なクローニング法を開発した(図1)。
- ② この方法を用いた場合、表1のようにOstranderらの方法をそのまま家禽に応用した場合より、30倍以上効率的にマイクロサテライトDNAを単離できる。
- ③ この方法では、PCR産物クローニング用に開発されたプラスミドベクターpCR-Script(Stratagene)を使用することにより、脱リン酸化処理を施したDNA断片のクローニング効率を上げ、さらに大腸菌XL1-Blue MRF'を使用することによって形質転換効率を上げた。これによって、プライマー伸長反応に供与するクローン数を飛躍的に増加させた。
- ④ CAリピートを含むクローンを選択する目的で、調製した一本鎖DNA、(CA)₁₀オリゴヌクレオチド、dNTP、耐熱性ポリメラーゼを混合し、高温下でプライマー伸長反応を行った。その後、一本鎖DNA特異的分解酵素であるmung beanヌクレアーゼを作用させることで、二本鎖DNAの効率的な選別を可能とした。

[成果の活用面・留意点]

本法は、すべての動物種においてマイクロサテライトDNAの効率的クローニング法として応用できる。

[具体的データ]

図1 マイクロサテライトDNAのクローニング手順

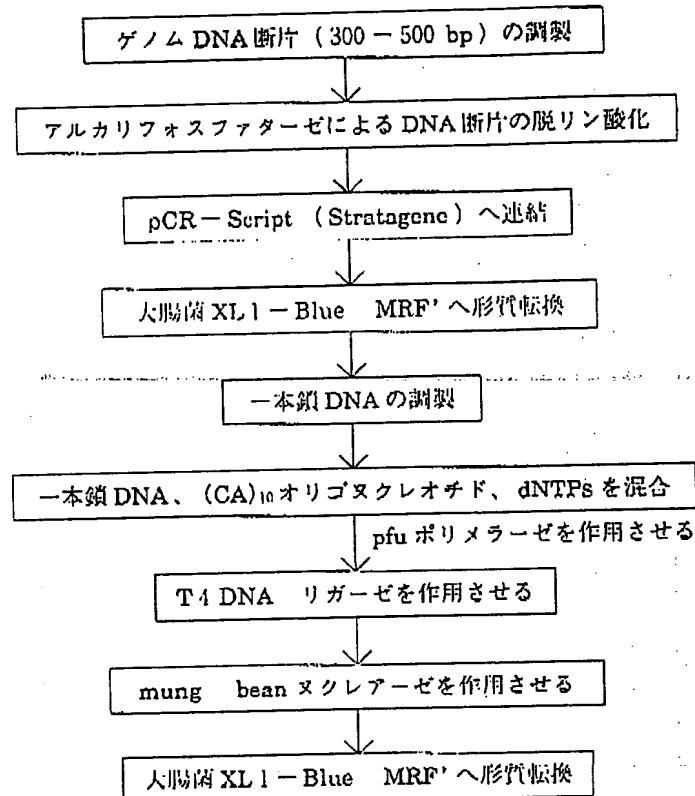


表1 これまでの方法との効率比較

	今回の方法	Ostranderらの方法*
(CA) _n 陽性クローンの割合 平均CA繰り返し回数	7.0% 13.3回	2.1% 7.8回

(* Cheng & Crittenden, 1994)

[その他]

研究課題名：動物遺伝資源評価のためのDNA多型マーカーの開発

予算区分：経常

研究期間：平成7年度（平成6～8年度）

研究担当：高橋秀彦・董澤圭二郎・古川 力

発表論文等：1) Takahashi *et al.* : An efficient method to clone chicken microsatellite repeat sequences. Japanese poultry science in press.

2) Takahashi *et al.* : Efficient cloning method to detect microsatellite markers in chickens. 第20回ベルツビルシンポジウム講演要旨 p32, 1995

3) 高橋ら：多型DNAマーカーの効率的クローニング法の検討。第90回日本畜産学会大会講演要旨 p177, 1995

4) 高橋ら：ニワトリのマイクロサテライトDNAマーカー単離の効率化。平成7年度日本家禽学会秋季大会講演要旨 p11, 1995